

**ÖSTERREICHISCHES PATENTAMT**

A-1200 Wien, Dresdner Straße 87

REC'D 23 FEB 2004

WIPO

PCT

Kanzleigebühr € 36,00
Gebührenfrei
gem. § 14, TP 1. Abs. 3
Geb. Ges. 1957 idgF.

Aktenzeichen **A 285/2003**

Das Österreichische Patentamt bestätigt, dass

**die Firma DSM Fine Chemicals Austria Nfg GmbH & CoKG
in A-4021 Linz, St. Peter-Straße 25
(Oberösterreich),**

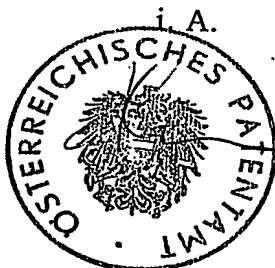
am **27. Feber 2003** eine Patentanmeldung betreffend

**"Verfahren zur Herstellung chiraler α -Hydroxycarbonsäuren durch
enzymatische Hydrolyse von chiralen Cyanhydrinen",**

überreicht hat und dass die beigeheftete Beschreibung samt Zeichnungen
mit der ursprünglichen, zugleich mit dieser Patentanmeldung überreichten
Beschreibung samt Zeichnungen übereinstimmt.

Österreichisches Patentamt
Wien, am 12. Dezember 2003

Der Präsident:

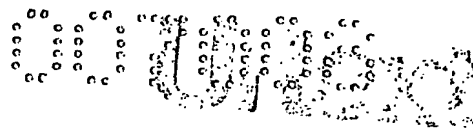


**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

HRNCIR
Fachoberinspektor



A 285 / 200 3



(51) Int. Cl.:

AT PATENTSCHRIFT

(11) Nr.

(73) Patentinhaber: DSM Fine Chemicals Austria Nfg GmbH & Co KG.

(54) Gegenstand: Verfahren zur Herstellung chiraler α -Hydroxycarbonsäuren
durch enzymatische Hydrolyse von chiralen Cyanhydrinen

(61) Zusatz zu Patent Nr.:

(67) Umwandlung aus GM

(62) Ausscheidung aus:

(22) (21) Angemeldet am:

(33) (32) (31) Unionspriorität:

(42) Beginn der Patentdauer:

Längste mögliche Dauer:

(45) Ausgegeben am:

(72) Erfinder:

(60) Abhängigkeit:

(56) Entgegenhaltungen, die für die Beurteilung der Patentierbarkeit in Betracht gezogen wurden

Verfahren zur Herstellung chiraler α -Hydroxycarbonsäuren durch enzymatische Hydrolyse von chiralen Cyanhydrinen

Optisch aktive α -Hydroxycarbonsäuren finden beispielsweise als Zusatzstoffe zu Futtermitteln oder bei der Gewinnung pharmazeutischer Wirkstoffe, Vitamine und Flüssigkristalle Verwendung.

Diese optisch aktiven α -Hydroxycarbonsäuren lassen sich weiters beispielsweise nach Effenberger et al., Angew. Chem. 95 (1983) Nr.1, Seite 50, vorteilhaft in anderweitig nur sehr schwer herzustellende N-substituierte optisch aktive α -Aminosäuren überführen.

Chirale α -Hydroxycarbonsäuren sind heutzutage chemisch, fermentativ oder enzymatisch zugänglich.

Aus der Literatur ist deshalb eine Reihe verschiedener Synthesemöglichkeiten von chiralen α -Hydroxycarbonsäuren bekannt.

So können racemische Cyanhydrine unter Zusatz geeigneter Mikroorganismen zu den gewünschten chiralen α -Hydroxycarbonsäuren hydrolysiert werden.

Die Herstellung von chiralen α -Hydroxycarbonsäuren, speziell die Herstellung von optisch aktiver Milchsäure oder Mandelsäure aus racemischen Cyanhydrinen mit verschiedenen Mikroorganismen der Gattungen *Aliccaligenes*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Rhodococcus*, *Candida* u.s.w. ist beispielsweise in EP 0 449 684, EP 0 527 553, EP 0 610 048, u.s.w. beschrieben.

Aus diesem Stand der Technik ist es auch bekannt, dass wenn ein racemisches Cyanhydrin enzymatisch unter Verwendung einer Nitrilase zu der korrespondierenden α -Hydroxycarbonsäure hydrolysiert wird, das Problem auftritt, dass das Enzym innerhalb kurzer Zeit inaktiviert wird und so die gewünschte α -Hydroxycarbonsäure meist nur in geringen Ausbeuten und Konzentrationen erhalten wird. Dies gilt auch bei der Verwendung von Nitrilhydratasen, die das Cyanhydrin zu dem korrespondie-

renden α -Hydroxyamid umwandeln. Die Hydroxyamide können sodann wiederum zu den korrespondierenden α -Hydroxycarbonsäuren umgesetzt werden.

Es ist auch bekannt, beispielsweise aus Angew. Chem. 1994, 106, Seite 1615f., dass sich optisch aktive Cyanhydrine ohne Racemisierung mit konzentrierter Salzsäure zu den korrespondierenden chiralen α -Hydroxycarbonsäuren hydrolysieren lassen. Die optische Reinheit der so hergestellten chiralen α -Hydroxycarbonsäuren entspricht dabei der optischen Reinheit des eingesetzten chiralen Cyanhydrins, auch wenn dieses in-situ durch enzymkatalysierte Addition einer Cyanidgruppe an einen entsprechenden Aldehyd oder ein Keton erhalten und ohne Isolierung bzw. Aufreinigung weiterverarbeitet wird.

Nachteilig bei dieser Reaktion ist, dass empfindliche Substrate zersetzt werden und das Auftreten von Korrosion.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, ein Verfahren zu finden, bei welchem so polare Nitrile wie chirale Cyanhydrine mit einer milden und effizienten Methode in die korrespondierenden chiralen Hydroxycarbonsäuren überführt werden können, wobei die Hydroxycarbonsäuren in etwa die gleiche enantiomere Reinheit wie die Cyanhydrine aufweisen.

Unerwarteterweise konnte diese Aufgabe durch die Verwendung eines speziellen Bakteriums aus der Gattung *Rhodococcus* gelöst werden.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist demnach ein Verfahren zur Herstellung von chiralen α -Hydroxycarbonsäuren, das dadurch gekennzeichnet ist, dass (R)- oder (S)-Cyanhydrine in Gegenwart von *Rhodococcus erythropolis* NCIMB 11540 durch enzymatische Hydrolyse in die korrespondierenden (R)- oder (S)- α -Hydroxycarbonsäuren überführt werden.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren werden (*R*)- und (*S*)-Cyanhydrine in (*R*)- und (*S*)- α -Hydroxycarbonsäuren mit einer optischen Reinheit von bis zu > 99%ee überführt.

Als Ausgangsverbindungen dienen (*R*)- und (*S*)-Cyanhydrine, die durch enzymatische oder chemisch katalysierte Addition einer Cyanidgruppe an die entsprechenden Aldehyde oder Ketone hergestellt werden.

Die enzymatische oder chemisch katalysierte Addition einer Cyanidgruppe an die entsprechenden Aldehyde oder Ketone kann dabei analog dem Stand der Technik, beispielsweise analog EP 0 951 561, EP 0 927 766, EP 0 632 130, EP 0 547 655, EP 0 326 063 u.s.w., erfolgen.

Als Ausgangsverbindungen eignen sich die im Stand der Technik zitierten Aldehyde und Ketone.

Beispiele für geeignete Aldehyde sind dabei aliphatische, aromatische oder heteroaromatische Aldehyde. Unter aliphatischen Aldehyden sind dabei gesättigte oder ungesättigte aliphatische, geradkettige, verzweigte oder cyclische Aldehyde zu verstehen. Bevorzugte aliphatische Aldehyde sind geradkettige Aldehyde mit insbesondere 2 bis 18 C-Atomen, besonders bevorzugt von 2 bis 12, die gesättigt oder ein- oder mehrfach ungesättigt sind. Der Aldehyd kann dabei sowohl C-C-Doppelbindungen als auch C-C-Dreifachbindungen aufweisen. Der Aldehyd kann unsubstituiert oder ein- oder mehrfach durch unter den Reaktionsbedingungen inerte Gruppen, beispielsweise durch gegebenenfalls substituierte Aryl- oder Heteroarylgruppen, wie Phenyl- oder Indolylgruppen, durch C₁-C₆-Alkyl, gegebenenfalls substituierte Cycloalkylgruppen, die ein oder mehrere Heteroatome aus der Gruppe O, S, P, oder N aufweisen können, Halogen-, Ether-, Alkohol-, Acyl-, Carbonsäure-, Carbonsäureester-, Nitro- oder Azidogruppen substituiert sein.

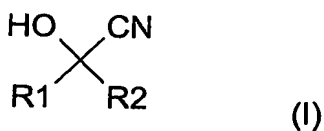
Beispiele für aromatische oder heteroaromatische Aldehyde sind Benzaldehyd bzw. verschieden substituierte Benzaldehyde wie etwa 2-Chlorbenzaldehyd, 3,4-

Difluorbenzaldehyd, 4-Methylbenzaldehyd, 3-Phenoxybenzaldehyd, 4-Fluor-3-phenoxybenzaldehyd, weiters Furfural, Anthracen-9-carbaldehyd, Furan-3-carbaldehyd, Indol-3-carbaldehyd, Naphthalin-1-carbaldehyd, Phthaldialdehyd, Pyrazol-3-carbaldehyd, Pyrrol-2-carbaldehyd, Thiophen-2-carbaldehyd, Isophthalaldehyd oder Pyridinaldehyde u.s.w..

Beispiele für Ketone sind aliphatische, aromatische oder heteroaromatische Ketone, bei denen das Carbonylkohlenstoffatom ungleich substituiert ist. Unter aliphatischen Ketonen sind geradkettige, verzweigte oder cyclische Ketone zu verstehen. Die Ketone können gesättigt oder ein- oder mehrfach ungesättigt sein. Sie können unsubstituiert oder ein- oder mehrfach durch unter den Reaktionsbedingungen inerte Gruppen, beispielsweise durch gegebenenfalls substituierte Aryl- oder Heteroarylgruppen wie Phenyl- oder Indolylgruppen, durch Halogen-, Ether-, Alkohol-, Acyl-, Carbonsäure-, Carbonsäureester-, Nitro- oder Azidogruppen substituiert sein.

Beispiele für aromatische oder heteroaromatische Ketone sind Acetophenon, Indolylaceton u.s.w..

Bevorzugt werden (R)- oder (S)-Cyanhydrine der Formel



in der R1 und R2 unabhängig voneinander H, einen gegebenenfalls ein- oder mehrfach mit unter den Reaktionsbedingungen inerten Substituenten substituierten C₁-C₆-Alkyl- oder Alkenylrest oder einen gegebenenfalls ein- oder mehrfach mit unter den Reaktionsbedingungen inerten Substituenten substituierten Phenylrest bedeuten, mit der Maßgabe, dass R1 und R2 nicht beide H sind.

Bevorzugte unter den Reaktionsbedingungen inerte Substituenten sind beispielsweise Halogene, wie Fluor, Brom und Chlor, C₁-C₆-Alkyl oder -Alkoxy, Ether, Ester, Acetale oder gegebenenfalls substituiertes Phenyl und Phenyloxy.

Besonders bevorzugt eignen sich für das erfindungsgemäße Verfahren (R)- oder (S)-Cyanhydrine, wie etwa (R)- oder (S)-2-Hydroxy-4-phenyl-butyronitril, (R)- oder (S)-2-Chlormandelonitril, (R)- oder (S)-Mandelonitril, (R)- oder (S)-4-Methylmandelonitril, (R)- oder (S)-3-Phenoxymandelonitril, (R)- oder (S)-2-Hydroxy-2-methyl-heptannitril, (R)- oder (S)-2-Hydroxy-2-phenyl-propionitril, (R)- oder (S)-2-Hydroxy-3-pentennitril, (R)- oder (S)-1-Hydroxy-cyclohexannitril, (R)- oder (S)-Acetophenoncyanhydrin.

Das entsprechende (R)- oder (S)- Cyanhydrin wird sodann erfindungsgemäß enzymatisch hydrolysiert.

Die enzymatische Hydrolyse erfolgt erfindungsgemäß in Anwesenheit von *Rhodococcus erythropolis* NCIMB 11540.

Mit *Rhodococcus erythropolis* NCIMB 11540 wurde unerwarteterweise ein Mikroorganismus gefunden, der sich dadurch auszeichnet, dass er über ein Nitrilhydratase/Amidase-Enzymsystem verfügt, das die Nitrilfunktion von derart polaren Nitrilen, wie die oben angeführten Cyanhydrine hydrolysieren kann.

Durch das Nitrilhydratase/Amidase-Enzymsystem von *Rhodococcus erythropolis* NCIMB 11540 werden die chiralen Cyanhydrine im ersten Schritt durch die Nitrilhydratase in das korrespondierende chirale Hydroxyamid hydrolysiert, welches sodann in einem zweiten Hydrolyseschritt durch die Amidase in die entsprechende chirale α -Hydroxycarbonsäure überführt wird.

Der Mikroorganismus kann bei dem erfindungsgemäßen Verfahren in jeglicher Form, beispielsweise in Form von gemahlenen Zellen, rohen oder gereinigten Enzymen, rekombinanten Enzymen, immobilisierten Zellen oder Enzymen, lyophilisierten Zellen oder von „resting cells“ eingesetzt werden.

Bevorzugt werden rekombinante Enzyme, resting cells oder lyophilisierte Zellen, besonders bevorzugt rekombinante Enzyme oder resting cells verwendet.

Neben dem direkten Einsatz der Nitrilhydratase/Amidase-aktiven Präparationen von *Rhodococcus erythropolis* NCIMB 11540 Zellen stellt die Verwendung von rekombinanten, in einem geeigneten Mikroorganismus, wie etwa *E. coli*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces*, *Aspergillus*, *K. Lactis* u.s.w. exprimierten Präparationen eine gute Alternative dar. Dabei werden die entsprechenden Gene mit Hilfe von Plasmidkonstrukten in geeignete Wirtszellen, beispielsweise in *E. coli*-, *Pichia pastoris*-, *Saccharomyces*-, *Aspergillus*-, *K. Lactis*- Wirtszellen eingebracht. Durch Wahl eines induzierbaren Promoters können sowohl die Nitrilhydratase als auch die Amidase in aktiver Form überexprimiert werden. Im Falle der Amidase können hierbei weit höhere Aktivitätsniveaus erreicht werden als bei entsprechender Fermentation der *Rhodococcus* Zellen.

Der Mikroorganismus wird sodann in der gewünschten Form in einem wässrigen Medium, wie Wasser oder einer Pufferlösung, suspendiert. Geeignete Pufferlösungen sind beispielsweise Phosphatpuffer, wie etwa K/Na-Phosphatpuffer, PBS-Puffer, Butyratpuffer, Citratlösungen u.s.w..

Der pH-Wert der verwendeten Pufferlösung sollte dabei in einem Bereich von pH 4.5 bis pH 11, bevorzugt von 5.5 bis 8.5 liegen.

Anschließend wird die so erhaltene Suspension mit dem entsprechenden chiralen Cyanhydrin versetzt. Da es sich bei den chiralen Cyanhydrinen um lipophile Verbindungen mit beschränkter Wasserlöslichkeit handelt, ist die Verwendung eines Lösungsvermittlers als Cosolvens notwendig, um die Cyanhydrine im wässrigen Medium in Lösung zu bringen.

Als Lösungsvermittler eignen sich beispielsweise organischen Lösungsmittel, Tenside, Phasentransferkatalysatoren, u.s.w..

Organische Lösungsmittel, die sich für das erfindungsgemäße Verfahren als Cosolvens eignen sind solche, die erstens das Substrat ausreichend lösen und zweitens die Enzymaktivität so wenig wie möglich beeinträchtigen.

Beispiele dafür sind Dimethylsulfoxid (DMSO), Dimethylformamid (DMF), C₁-C₆-Alkohole, wie etwa Methanol, Ethanol, i-Propanol, 1-Butanol, 2-Butanol, t-Butanol oder 1-Pentanol, Toluol oder t.-Butylmethylether (TBME) oder Gemische derselben. Bevorzugt werden als Cosolvens DMSO, DMF, Ethanol, i-Propanol oder Gemische derselben und besonders bevorzugt DMSO und DMF eingesetzt.

Der Cosolvensanteil sollte zwischen 0,5 und 20 Vol.%, bezogen auf das Gesamtvolumen der Reaktionslösung liegen.

Bevorzugt liegt der Cosolvensanteil zwischen 1 und 15 Vol% und besonders bevorzugt zwischen 2 und 10 Vol%.

Die Substratkonzentration in der Reaktionslösung sollte bei dem erfindungsgemäßen Verfahren in einem Bereich von 1g/l bis zu 100g/l (bezogen auf das Gesamtvolumen der Reaktionslösung) liegen, wobei die Akzeptanz einer ausreichend hohen Substratkonzentration die Grundvoraussetzung für die Anwendung der erfindungsgemäßen enzymatischen Hydrolyse im präparativen Maßstab ist.

Bevorzugt sind Substratkonzentrationen bis zu 50g/l, besonders bevorzugt bis zu 25g/l.

Die mögliche umsetzbare Substratkonzentration hängt von der eingesetzten Enzymmenge ab. Für eine effiziente, quantitative Umsetzung muss der erste Hydrolyseschritt sehr rasch erfolgen, um den Zerfall des Cyanhydrins und die dadurch bedingte Racemisierung zu vermeiden, sodass relativ hohe Zelldichten erforderlich sind.

Es ist dabei zu beachten, dass eine ausreichende Durchmischung des Reaktionssystems gewährleistet ist.

Die Zell- bzw. Enzymmenge hängt von der Aktivität des Mikroorganismus in der eingesetzten Form, sowie von der Substratkonzentration und dem Cosolvens ab.

Der pH-Wert des Reaktionsgemisches sollte zwischen 4.5 und 11, bevorzugt zwischen 5,5 und 8 liegen.

Gegebenenfalls kann dem Reaktionsgemisch zur Einstellung des pH-Wertes noch eine geeignete Säure bzw. saure Salze, wie etwa Phosphorsäure, Borsäure, Citronensäure, u.s.w. zugesetzt werden.

Die erfindungsgemäße enzymatische Hydrolyse wird bei einer Temperatur von 10 bis 60°C, bevorzugt bei 15 bis 50°C und besonders bevorzugt bei 20 bis 45°C durchgeführt.

Nach erfolgter Hydrolyse zu den gewünschten chiralen α -Hydroxycarbonsäuren, erfolgt deren Isolierung aus dem Reaktionsgemisch mittels einer bekannten Technik, wie etwa Abzentrifugieren der Zellen, Extraktion des Produktes nach Ansäuern mit HCl (z.B.: pH 2) und gegebenenfalls weitere Aufreinigung durch Aktivkohlefiltration und Umkristallisation.

Durch die erfindungsgemäße Verwendung von *Rhodococcus erythropolis* NCIMB 11540 werden somit so polare Nitrile, wie chirale Cyanhydrine auf einfache und effiziente Weise unter milden Bedingungen in die korrespondierenden chiralen α -Hydroxycarbonsäuren überführt, wobei keinerlei Racemisierung auftritt. Die gewünschten α -Hydroxycarbonsäuren werden dabei, in Abhängigkeit vom ee-Wert des eingesetzten Cyanhydrins, in hoher optischer Reinheit von bis zu über 99% und in hohen Ausbeuten von bis zu über 98% erhalten.

Beispiel 1: Herstellung des Biokatalysators

Für die Herstellung der Biomasse von *Rhodococcus erythropolis* NCIMB 11540 wurde ein komplexes Standardmedium (Medium A, s. Tab.1) verwendet. Die Stammhaltung erfolgte auf Agar-Platten mit Medium A (Verfestigung mit 15g/l Agar). Die Platten wurden durch seitliches Umwickeln mit Parafilm verschlossen und im Kühlschrank bei 4° C gelagert.

Das Wachstum der Flüssigkulturen erfolgte in 1000ml Erlenmeyerkolben mit Schikannen mit 250ml Medium A bei 30°C und 130rpm.

Variante I (ohne Vorkultur): Etwa die Hälfte der Biomasse einer Agarplatte wurde in 5ml steriler, physiologischer Kochsalzlösung suspendiert. Je eine Zellsuspension wurde 250ml Kulturmedium zugesetzt.

Variante II (mit Vorkultur): Für die Vorkultur wurde etwas Biomasse einer Agarplatte in 5ml steriler, physiologischer Kochsalzlösung suspendiert. Je eine Zellsuspension wurde 100ml Kulturmedium zugesetzt (= Vorkultur). Nach 20-24h Wachstum wurden 5ml dieser Vorkultur je 250mL Kulturmedium zugesetzt.

Die Zellernte erfolgte mittels Zentrifugation bei ca. 3000rpm für 30min bei 0-4°C. Die Zellen wurden einmal mit K/Na-Phosphatpuffer (50mM, pH 6.5) gewaschen. Dann wurden die Zellen in frischem Puffer resuspendiert und entweder nach Schockfrieren lyophilisiert (Umsetzungen mit lyophilisierten Zellen, Beispiel 2), oder diese Zellsuspension (ca. 6-8% des Kulturvolumens) wurde direkt für die biokatalytischen Umsetzungen verwendet (Umsetzungen mit Resting cells, Beispiel 3).

Tabelle 1: Zusammensetzung von Medium A

Sterilisationsgruppe	Substanz	Konzentration [g/l]
I	Na_2HPO_4	4.97
	KH_2PO_4	2.04
II	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2
III	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.02
	Ammoniumeisen(III)-citrat	0.05
	Spurenlösung SL-6	1ml/l
IV	Hefeextrakt	1
	Fleischpepton	10
V	Glucose	10

Beispiel 2: Umsetzungen mit lyophilisierten Zellen im analytischen Maßstab

31.6mg, 52.6mg bzw. 105.2mg lyophilisierte Zellen wurden in 10ml Phosphatpuffer (50mM, pH 6.5) ca. 1 Stunde bei 130rpm und 20-25°C rehydratisiert. Je 475µl dieser Zellsuspension wurden in 1.5ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und mit 25µl einer ca. 200mM Substratlösung von 2-Hydroxy-4-phenyl-butyronitril in DMSO versetzt (3mg, 5mg bzw. 10mg Zellen/ml, S.-Konz. ca. 10mM, 5% DMSO). Die Umsetzung wurde im Thermomixer bei 30°C und 1000rpm durchgeführt. Nach 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 30, 60 und 120 Minuten wurde jeweils ein Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 0.5ml 1N HCl versetzt. Nach Zentrifugation (5min, 13.000rpm) und entsprechender Verdünnung wurden die Konzentrationen von Cyanhydrin, Hydroxyamid und Hydroxysäure mittels HPLC bestimmt.

Tabelle 2 Hydrolyse von 2-Hydroxy-4-phenyl-butyronitril durch lyophilisierte *Rhodococcus erythropolis* NCIMB 11540 Zellen (10mg Zellen/ml; Substratkonz.: 10mM)
Konzentration (mM) von Substrat, Hydroxyamid und Hydroxycarbonsäure in Abhängigkeit von der Zeit (min)

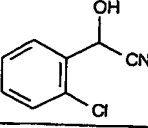
	0 min	10min	20min	30min	60min	100min	120min
Substrat	10mM	1,9mM	0,7mM	0,25mM	0mM	0mM	0mM
Amid	0mM	4,7mM	3,5mM	3,2mM	2mM	1,1mM	0,5mM
Säure	0mM	3,3mM	5,4mM	6,1mM	7,5mM	8,2mM	8,5mM

Beispiel 3: Enzymatische Hydrolyse unter Verwendung von Resting cells und lyophilisierten Zellen

Die Herstellung des Biokatalysators erfolgte analog Beispiel 1, Variante I, 2 Kulturkolben. Nach 20 Stunden ($OD_{546} = 3.5$ bzw. 1.8) wurden Zellen aus je 4 mal 10ml Fermentationsbrühe abzentrifugiert und einmal mit K/Na- PO_4 Puffer (pH 6.5, 50mM) gewaschen. Je 2 Zellproben wurden vor Aktivitätsbestimmung lyophilisiert, die anderen beiden wurden als Resting cells verwendet.

Die Zellen wurden in 1.8ml K/Na- PO_4 Puffer (pH 6.5, 50mM) resuspendiert (lyophilisierte Zellen wurden zur Rehydratation 1h geschüttelt). Die Reaktion wurde durch Zusatz von 200 μ l einer 200mM Substratlösung in DMSO gestartet (Substrat-Konz. ca. 20mM) und bei 30°C und 130rpm im Schüttelschrank durchgeführt. Nach 30min, 60min und 17h wurden 200 μ l entnommen und mit 200 μ l 1N HCl versetzt. Nach Zentrifugation (5min, 13.000rpm) und Verdünnung wurden mittels HPLC die Umsätze bestimmt. Dabei wurden nur das Substrat und die beiden Produkte berücksichtigt Als Substrat wurde (*R*)-2-Chlormandelonitril (ee >99%) verwendet. Die Ergebnisse sind in Tab. 3 dargestellt.

Tabelle 3: Ergebnisse der Umsetzungen von Kultur 1 (OD_{546} 3.5), Substrat: (R)-2-Chlormandelonitril

	Resting cells		Lyophilisierte Zellen (19mg/mL)	
	Umsatz CH [%] ¹	Umsatz HA[%] ²	Umsatz CH [%] ¹	Umsatz HA[%] ²
30min	100	2	40	<1
60min	--	4	41	0
17h	--	42	43	<1

1: Der Umsatz des Cyanhydrins (CH) bezieht sich auf beide Produkte (Hydroxyamid und Hydroxysäure).

2: Der Umsatz des Hydroxyamides (HA) bezieht sich auf die Menge an Hydroxysäure, die aus dem vorhandenen Hydroxyamid gebildet wurde.

Beispiel 4: Enzymatische Hydrolyse unter Verwendung von unterschiedlichen Substratkonzentrationen

Versuch 4.1:

Bei Versuch 4.1 wurde die Reaktion im analytischen Maßstab (Reaktionsvolumen 1ml) mit 3 Substratkonzentrationen (2.2g/l, 6.6g/l, 13.2g/l) durchgeführt.

Die Herstellung des Biokatalysators erfolgte gemäß Beispiel 1, Variante II, 2l Fermentationsmedium, Ernte nach 20 Stunden (OD_{546} 6.1). Die Zellen aus 8 mal 10ml Fermentationslösung wurden in Kulturröhrchen abzentrifugiert. Die erhaltene Zellmasse wurde einmal mit je 2ml K/Na- Phosphatpuffer (pH 6.5, 50mM) gewaschen. Der Inhalt von 2 Röhrchen wurde zur Bestimmung des Trockengewichtes lyophilisiert.

Auswaage: 1. 37mg lyophilisierte Zellen / 10ml Fermentationslösung
2. 30mg

(Diese Menge entsprach ca. dem Einsatz an Zellen/ml bei den folgenden Umsetzungen.)

Der Inhalt der restlichen 6 Röhrchen wurde in 950µl Puffer resuspendiert (OD ca. 40) und in Eppendorfers überführt. Diesen Zellsuspensionen wurden je 50µl verschieden konzentrierter Substratlösungen (3 Konzentrationen, Parallelansätze, 5% DMSO als Cosolvens) zugesetzt. Die Eppendorfers wurden am Thermomixer bei 30°C und 1000rpm geschüttelt. Zur Umsatzkontrolle wurden jeweils 200µl entnommen und mit 200µl 1N HCl versetzt. Nach Zentrifugation (5min, 13.000rpm) und Verdünnung wurden die Umsätze mit HPLC bestimmt.

Folgende Konzentrationen (*R*)-2-Chlormandelonitril wurden verwendet:

- a. Substratlösung: 11mg (*R*)-2-Chlormandelonitril in 250µl DMSO (ca. 260mM)
Substratkonzentration im Ansatz: 2.2g/l (13.1mM)
- b. Substratlösung: 33mg (*R*)-2-Chlormandelonitril in 250µl DMSO (ca. 290mM)
Substratkonzentration im Ansatz: Substratkonzentration: 6.6g/l (39.4mM)
- c. Substratlösung: 66mg (*R*)-2-Chlormandelonitril in 250µl DMSO (ca. 1580mM)
Substratkonzentration im Ansatz: 13.2g/l (78.8mM)

Ein Vergleich der Ansätze a-c ist in Tabelle 4.1 anhand der Bildung der 2-Chlormandelsäure (in %) dargestellt. Bei allen Ansätzen wurde die Hydroxysäure quantitativ gebildet. Es zeigte sich, dass auch höhere Substratkonzentrationen problemlos akzeptiert werden.

Tabelle 4.1: Vergleich der Ansätze a-c anhand der Bildung von (R)-2-Chlormandelsäure in %

	10min	20min	30min	40min	50min
a	77%	86%	92%	94%	96%
b	45%	70%	82%	89%	95%
c	58%	85%	96%	98%	100%

Versuch 4.2:

Bei Versuch 4.2 wurde die Reaktion mit 2 verschiedenen Substratkonzentrationen (10g/l, 20g/l) im 5ml-Maßstab durchgeführt.

Die Herstellung des Biokatalysators erfolgte gemäß Beispiel 1, Variante II, 2l Fermentationsmedium, Ernte nach 19 Stunden (OD_{546} 8.4). Die Zellen wurden in ca. 140ml Puffer resuspendiert (Resting cells, OD_{546} 52). Jeweils 4.75ml dieser Zellsuspension wurden für die enzymatischen Umsetzungen verwendet.

Es wurden 2 verschiedene Konzentrationen von (R)-2-Chlormandelonitril in Parallelansätzen untersucht. Die Reaktion wurde durch Zusatz von 250µl Substratlösung gestartet und in Kulturröhrchen im Schüttelschrank bei 30°C und 130rpm durchgeführt. Zur Umsatzkontrolle wurden jeweils 200µl entnommen und mit 200µl 1N HCl versetzt. Nach Zentrifugation (5min, 13.000rpm) und Verdünnung wurden die Umsätze mit HPLC bestimmt.

- a. 50mg (R)-2-Chlormandelonitril, gelöst in 250µL DMSO ($[S] = 60\text{mM}$, 10g/L, Cosolvens: 5% DMSO)

Bereits nach 30 Minuten war das gesamte Cyanhydrin zum Hydroxyamid umgesetzt, nach 2h waren ca. 40% Hydroxysäure gebildet. Nach 20h war die Umsetzung quantitativ.

- b. 100mg (*R*)-2-Chlormandelonitril, gelöst in 250µL DMSO ([S] = 120mM, 20g/l, Cosolvens: 5% DMSO)

Bereits nach 30 Minuten war das gesamte Cyanhydrin zum Amid umgesetzt, nach 18h waren 36% Hydroxysäure gebildet. Nach 43h waren 41% Hydroxysäure gebildet, danach fand keine weitere Umsetzung mehr statt.

Versuch 4.3:

Beim Versuch 4.3 wurden Umsetzungen mit 10g/l und 15g/l (*R*)-2-Chlormandelonitril durchgeführt. Weiters wurde nach vollständigem Umsatz der ee der gebildeten Hydroxysäure bestimmt.

Die Herstellung des Biokatalysators erfolgte gemäß Beispiel 1 Variante II, 2.75l Fermentationsmedium, Ernte nach 20 Stunden. Die Zellen wurden in ca. 200ml Puffer resuspendiert (Resting cells, OD₅₄₆ 44). Jeweils 4.85ml dieser Zellsuspension wurden für die enzymatischen Umsetzungen verwendet.

Es wurden 2 verschiedene Konzentrationen von (*R*)-2-Chlormandelonitril in Parallelansätzen untersucht. Die Reaktion wurde durch Zusatz von 150µl Substratlösung gestartet und in Kulturröhrchen im Schüttelschrank bei 40°C und 150rpm durchgeführt. Die Umsatzkontrolle erfolgte mittels HPLC. Bei vollständigem Umsatz wurde die Hydroxysäure nach Ansäuern extrahiert und der ee bestimmt.

- a. 50mg (*R*)-2-Chlormandelonitril, gelöst in 150µl DMSO ([S] = 60mM, 10g/l, Cosolvens: 3% DMSO)

Bereits nach 30 Minuten war das gesamte Cyanhydrin zum Amid umgesetzt, nach 2h waren 80% Hydroxysäure gebildet, nach 19h war die Hydrolyse zur Hydroxysäure vollständig (Produkt-ee > 99%).

- b. 75mg (*R*)-2-Chlormandelonitril, gelöst in 150µl DMSO ([S] = 90mM, 15g/l, Cosolvens: 3% DMSO).

Bereits nach 30 Minuten war das gesamte Cyanhydrin zum Amid umgesetzt, nach 2h waren ca. 60% Hydroxysäure gebildet, nach 19h war die Hydrolyse zur Hydroxysäure vollständig (Produkt-ee = 99%).

Beispiel 5: Enzymatische Hydrolyse unter Verwendung unterschiedlicher Cosolventien

Versuch 5.1:

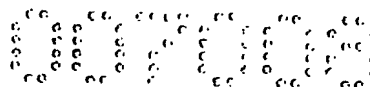
Bei Umsetzungen im 50ml-Maßstab wurde DMSO mit EtOH als Cosolvens verglichen. Es wurde 5% Cosolvens verwendet, die Substratkonzentration betrug jedoch nur 4g/l (*R*)-2-Chlormandelonitril.

Biomasse aus 8 mal 250ml (abzüglich 80ml, s. Versuch 4.1) Fermentationsmedium (OD ~ 6.1) wurde nach 20h geerntet. Die Zellen wurden in 100ml K/Na- Phosphatpuffer (pH 6.5, 50mM) suspendiert. Diese Zellsuspension (OD 60) wurde für die enzymatischen Umsetzungen verwendet. Die Umsetzungen von (*R*)-2-Chlormandelonitril, gelöst in DMSO oder EtOH wurden in 100ml Schliffenmeyerkolben bei 150rpm und 30°C durchgeführt. Zur Umsatzkontrolle mittels HPLC wurden jeweils 200µl Probe mit 200µl 1N HCl versetzt, zentrifugiert (5min, 13.000rpm) und vor der Messung verdünnt. Nach vollständigem Umsatz wurde der ee des Produktes bestimmt.

- a. 50mL Zellsuspension wurden mit 200mg (*R*)-2-Chlormandelonitril (>99%) gelöst in 2300µl DMSO und 200µl 0.1% H₃PO₄, versetzt.

Substratkonzentration: 4g/L (24mM), 5% DMSO als Cosolvens

Produkt-ee von (*R*)-2-Chlormandelsäure : 97%



b. 50mL Zellsuspension werden mit 200mg (*R*)-2-Chlormandelonitril (>99%) gelöst in 2300µl EtOH und 200µl 0.1% H₃PO₄, versetzt.

Substratkonzentration: 4g/l (24mM), 5% EtOH als Cosolvens

Produkt-ee von (*R*)-2-Chlormandelsäure: >99%

Versuch 5.2:

Hier wurden die Lösungsmittel DMSO, EtOH und ⁱPrOH wieder mit einem Anteil von 5% verwendet, die Substratkonzentration betrug 10g/l (*R*)-2-Chlormandelonitril. Die Reaktion wurde im 5ml-Maßstab durchgeführt.

Die Herstellung des Biokatalysators Beispiel 4, Versuch 4.2 (OD₅₄₆ 8.4). Jeweils 4.75ml der Zellsuspension (Resting cells, OD₅₄₆ 52) wurden für die enzymatischen Umsetzungen verwendet. Umsetzungen von (*R*)-2-Chlormandelonitril (>99%) gelöst in DMSO, EtOH und *i*-PrOH wurden in Kulturröhrchen bei 150rpm und 30°C durchgeführt (Parallelansätze).

Zur Umsatzkontrolle mittels HPLC wurden jeweils 200µl Probe mit 200µl 1N HCl versetzt, zentrifugiert (5min, 13.000rpm) und vor der Messung verdünnt. Nach vollständigem Umsatz wurde der ee des Produktes bestimmt.

a. 50mg (*R*)-2-Chlormandelonitril, gelöst in 250µl DMSO ([S] = 60mM, 10g/l, Cosolvens: 5% DMSO)

Bereits nach 30 Minuten war das gesamte Cyanhydrin zum Hydroxyamid umgesetzt, nach 2h waren ca. 40% Hydroxysäure gebildet. Nach 20h war die Umsetzung quantitativ (Produkt-ee = 95%).

b. 50mg (*R*)-2-Chlormandelonitril, gelöst in 250µl EtOH, ([S] = 60mM, 10g/l, Cosolvens: 5% EtOH)

Bereits nach 30 Minuten ist das gesamte Cyanhydrin zum Amid umgesetzt, nach 3h sind 35% Hydroxysäure gebildet, nach 19h ist die Hydrolyse zur Hydroxysäure zu

94% abgeschlossen, nach 28h ist die Umsetzung praktisch vollständig (Produkt-ee = 97%).

c. 50mg (*R*)-2-Chlormandelonitril, gelöst in 250µl *i*-PrOH, ([S] = 60mM, 10g/l, Cosolvens: 5% *i*-PrOH)

Bereits nach 30 Minuten war das gesamte Cyanhydrin zum Amid umgesetzt, nach 3h waren 8% Hydroxysäure gebildet, nach 44h waren 64 % Hydroxysäure gebildet (Produkt-ee = 92.3)

Beispiel 6: Enzymatische Hydrolyse bei unterschiedlichen Temperaturen

Versuch 6.1:

Bei Versuch 6.1 wurde der Reaktionsverlauf bei Reaktionstemperaturen von 30°C, 35°C, und 40°C verglichen. Die Ansätze wurden im 5ml-Maßstab mit einer Substratkonzentration von 10g/l (*R*)-2-Chlormandelonitril durchgeführt. Nach vollständigem Umsatz wurde der ee des Produktes bestimmt.

Die Herstellung des Biokatalysators erfolgte gemäß Beispiel 4, Versuch 4.2, (OD₅₄₆ 8.4). Jeweils 4.75ml der Zellsuspension (Resting cells, OD₅₄₆ 52) wurden für die enzymatischen Umsetzungen verwendet. Umsetzungen von 50mg (*R*)-2-Chlormandelonitril (>99%) ([S] = 60mM, 10g/l), gelöst in 250µl DMSO (5%) wurden bei 3 verschiedenen Temperaturen (30°C, 35°C, 40°C) in Kulturröhrchen bei 150rpm durchgeführt (Parallelansätze).

Zur Umsatzkontrolle mittels HPLC wurden jeweils 200µl Probe mit 200µl 1N HCl versetzt, zentrifugiert (5min, 13.000rpm) und vor der Messung verdünnt. Nach vollständigem Umsatz wurde der ee des Produktes bestimmt.

a. T = 30°C

Bereits nach 30 Minuten war das gesamte Cyanhydrin zum Amid umgesetzt, nach 2h waren 42% Hydroxysäure gebildet, nach ca. 20h war die Hydrolyse zur (R)-2-Chlormandelsäure vollständig (Produkt-ee = 95%).

b. T = 35°C

Bereits nach 30 Minuten war das gesamte Cyanhydrin zum Amid umgesetzt, nach 2h waren 65% Hydroxysäure gebildet, nach 19h war die Hydrolyse zur (R)-2-Chlormandelsäure vollständig (Produkt-ee = 96.5%).

c. T = 40°C

Bereits nach 30 Minuten war das gesamte Cyanhydrin zum Amid umgesetzt, nach 2h waren 86% Hydroxysäure gebildet, nach 19h war die Hydrolyse zur (R)-2-Chlormandelsäure vollständig (Produkt-ee = 97.9%).

Versuch 6.2:

Bei Versuch 6.2 wurde die Temperatur bis auf 50°C erhöht.

Die Herstellung des Biokatalysators erfolgte gemäß Beispiel 4, Versuch 4.3 (OD₅₄₆ 44). Jeweils 4.85ml der Zellsuspension (Resting cells, OD₅₄₆ 44) wurden für die enzymatischen Umsetzungen verwendet. Umsetzungen von 50mg (R)-2-Chlormandelonitril (>99%) ([S] = 60mM, 10g/l), gelöst in 150µl DMSO (3%) wurden bei 3 verschiedenen Temperaturen (30°C, 40°C, 50°C) in Kulturröhrchen bei 150rpm durchgeführt (Parallelansätze).

Zur Umsatzkontrolle mittels HPLC wurden jeweils 200µl Probe mit 200µl 1N HCl versetzt, zentrifugiert (5min, 13.000rpm) und vor der Messung verdünnt. Nach vollständigem Umsatz wurde der ee des Produktes bestimmt.

a. $T = 30^{\circ}\text{C}$

Bereits nach 30 Minuten war das gesamte Cyanhydrin zum Amid umgesetzt, nach 2h waren 42% Hydroxysäure gebildet, nach 19h war die Hydrolyse zur Hydroxysäure vollständig (Produkt-ee > 99%).

b. $T = 40^{\circ}\text{C}$

Bereits nach 30 Minuten war das gesamte Cyanhydrin zum Amid umgesetzt, nach 2h waren 80% Hydroxysäure gebildet, nach 19h war die Hydrolyse zur Hydroxysäure vollständig (Produkt-ee > 99%).

c. $T = 50^{\circ}\text{C}$

Bereits nach 30 Minuten war das gesamte Cyanhydrin zum Amid umgesetzt, nach 2h waren 92% Hydroxysäure gebildet, nach 19h war die Hydrolyse zur Hydroxysäure vollständig (Produkt-ee > 99%).

Beispiel 7: Umsetzungen von Cyanhydrinen von Aldehyden mit *Rhodococcus erythropolis* NCIMB 11540 im halb-präparativen Maßstab

Für alle Umsetzungen wurde K/Na-Phosphatpuffer (50mM, pH 6.5) verwendet. Die Reaktionsverfolgung erfolgte mit HPLC. Nach Probenahme wurde zum Abstoppen der biokatalytischen Reaktion mit Probenvolumen 1N HCl versetzt (Parallelproben). Nach Zentrifugation (5min, 13.000rpm) wurde mit HPLC-Laufmittel verdünnt.

Zur Aufarbeitung wurde die Biomasse 30min bei 4°C und 3000rpm abzentrifugiert und einmal mit H_2O dest. gewaschen. Nach Ansäuern des Überstandes mit 1N HCl auf pH 2 wurde 3-4 mal mit TBME extrahiert.

Versuch 7.1:

Die Herstellung des Biokatalysators erfolgte gemäß Beispiel 1, Variante II. 3l Fermentationsmedium, Ernte nach 20 Stunden (OD_{546} 5.9). Die Zellen wurden zu ca. 180ml in Puffer resuspendiert (Resting cells, OD_{546} 80).

0.6g (*R*)-2-Chlormandelonitril (ee > 99%), gelöst in 1.5ml DMSO wurden 60ml dieser Zellsuspension zugesetzt. Die Hydrolyse wurde bei 30°C und 150rpm im Schüttelschrank durchgeführt. Nach 30min war das Cyanhydrin vollständig hydrolysiert, nach 17 Stunden war die Umsetzung zur (*R*)-2-Chlormandelsäure vollständig.

Rohausbeute: 0.73g (109%)

Produkt-ee: >99%

Versuch 7.2:

In Versuch 7.2 wurden einige Reaktionsparameter variiert. Als Standardbedingungen galten 10g/l Substrat und DMSO als Cosolvens (hier 2.5%). Ein zweiter Ansatz wurde mit 15g/l Substrat durchgeführt, ein weiterer mit 10g/l Substrat und DMF als Cosolvens.

Die Herstellung des Biokatalysators erfolgte gemäß Beispiel 1, Variante II. 3l Fermentationsmedium, Ernte nach 20 Stunden (OD_{546} 6.8). Die Zellen wurden zu ca. 190ml Puffer resuspendiert (Resting cells, OD_{546} 69). Drei Umsetzungen wurden durchgeführt.

Ansatz A: 0.3g (*R*)-2-Chlormandelonitril (ee>99%), gelöst in 750µl DMSO wurden 30ml dieser Zellsuspension zugesetzt. Die Hydrolyse wurde bei 40°C und 150rpm im Schüttelschrank durchgeführt. Nach 30min war das Cyanhydrin vollständig hydrolysiert, nach 5 Stunden war die Umsetzung zur (*R*)-2-Chlormandelsäure vollständig.

Rohausbeute: 0.31g (93%)

Produkt-ee: >99%

Ansatz B: 0.3g (*R*)-2-Chlormandelonitril (ee>99%), gelöst in 750µl DMF wurden 30ml dieser Zellsuspension zugesetzt. Die Hydrolyse wurde bei 40°C und 150rpm im Schüttelschrank durchgeführt. Nach 30min war das Cyanhydrin vollständig hydrolysiert, nach 5 Stunden war die Umsetzung zur (*R*)-2-Chlormandelsäure vollständig.

Rohausbeute: 0.30g (90%)

Produkt-ee: 98.5%

Ansatz C: 0.45g (*R*)-2-Chlormandelonitril (ee>99%), gelöst in 750µl DMSO wurden 30ml dieser Zellsuspension zugesetzt. Die Hydrolyse wurde bei 40°C und 150rpm im Schüttelschrank durchgeführt. Nach 30min war das Cyanhydrin vollständig hydrolysiert, nach 5 Stunden war die Umsetzung zur (*R*)-2-Chlormandelsäure praktisch vollständig.

Rohausbeute: 0.45g (90%)

Produkt-ee: >99%

Versuch 7.3:

Hier wurden 2 Ansätze mit verschieden großer Substratkonzentration (Ansatz A 10g/l, Ansatz B 15g/l) durchgeführt. Beide Umsetzungen verliefen nahezu gleich rasch und waren nach 2 Stunden vollständig.

Die Herstellung des Biokatalysators erfolgte gemäß Beispiel 1, Variante II. 3l Fermentationsmedium, Ernte nach 20 Stunden (OD₅₄₆ 1.2). Die Zellen wurden in ca. 180ml Puffer resuspendiert (Resting cells, OD₅₄₆ 70). Zwei Umsetzungen wurden durchgeführt.

Ansatz A: 0,8g (*R*)-2-Chlormandelonitril (ee>99%), gelöst in 1.6ml DMSO wurden der Zellsuspension (80ml) zugesetzt. Die Hydrolyse wurde bei 50°C und 150rpm im Schüttelschrank durchgeführt. Nach 15min war das Cyanhydrin vollständig hydrolysiert, nach 2 Stunden war die Umsetzung zur (*R*)-2-Chlormandelsäure vollständig.

Rohausbeute: 0.85g (95%)

Produkt-ee: >99%

Ansatz B: 1.2g (*R*)-2-Chlormandelonitril (ee>99%), gelöst in 1.6ml DMSO wurden der Zellsuspension (80ml) zugesetzt. Die Hydrolyse wurde bei 50°C und 150rpm im Schüttelschrank durchgeführt. Nach 30min war das Cyanhydrin vollständig hydrolysiert, nach 2 Stunden war die Umsetzung zur (*R*)-2-Chlormandelsäure vollständig.

Rohausbeute: 1.26g (94%)

Produkt-ee: 98.9%

Versuch 7.4:

Die Herstellung des Biokatalysators erfolgte gemäß Beispiel 1, Variante II, 2.5l Fermentationsmedium, Ernte nach 20 Stunden (OD₅₄₆ 6.9). Die Zellen wurden in ca. 160ml Puffer resuspendiert (Resting cells, OD₅₄₆ 63).

1.3g (*R*)-2-Chlormandelonitril (ee>99%), gelöst in 2.5ml DMSO wurden 140ml dieser Zellsuspension zugesetzt. Die Hydrolyse wurde bei 40°C und 150rpm im Schüttelschrank durchgeführt. Nach 15min war das Cyanhydrin vollständig hydrolysiert, nach 3 Stunden war die Umsetzung zur (*R*)-2-Chlormandelsäure vollständig.

Rohausbeute: 1.43g (98%)

Produkt-ee: >99%

Versuch 7.5:

Bei dieser Umsetzung wurde 1g Mandelonitril bei einer Substratkonzentration von 8g/l zur entsprechenden Hydroxysäure hydrolysiert.

Die Herstellung des Biokatalysators erfolgte gemäß Beispiel 1, Variante II, 2l Fermentationsmedium, Ernte nach 20 Stunden (OD₅₄₆ 8.4). Die Zellen wurden in ca. 120ml Puffer resuspendiert (Resting cells, OD₅₄₆ 74). Die Umsetzung wurde nach Tieffrieren des Biokatalysators über Nacht durchgeführt.

1.0g (R)-(+)-Mandelonitril, gelöst in 2.4ml DMSO wurde der Zellsuspension (120ml) zugesetzt. Die Hydrolyse wurde bei 40°C und 150rpm im Schüttelschrank durchgeführt. Nach 15min war das Cyanhydrin vollständig hydrolysiert, nach 5 Stunden war die Umsetzung zur (R)-Mandelsäure vollständig.

Rohausbeute: 1.16g (100%)

Produkt-ee: 93%

Beispiel 8: Umsetzungen von Cyanhydrinen von Ketonen mit *Rhodococcus erythropolis* NCIMB 11540 im halb-präparativen Maßstab

Es wurde ein K/Na-Phosphatpuffer (50mM, pH 6.5) verwendet. Die Reaktionsverfolgung erfolgte mit DC.

Zur Aufarbeitung wurde die Biomasse 20min bei 4°C und 6000rpm abzentrifugiert und einmal mit H₂O dest. gewaschen. Nach Ansäuern des Überstandes mit 1N HCl auf pH 2 wurde 3-4 mal mit TBME extrahiert.

Die Herstellung des Biokatalysators erfolgt gemäß Beispiel 1, Variante II, 2L Fermentationsmedium, Ernte nach 20 Stunden. Die Zellen wurden in ca. 60mL Puffer resuspendiert (Resting cells, OD₅₄₆ 60).

300mg (S)-Acetophenoncyanhydrin (25% Acetophenon, ee 94%), gelöst in 1mL DMSO wurden der Zellsuspension zugesetzt. Nach 20h war die Umsetzung lt. DC vollständig und das Produkt (enthält 1-Phenylethanol und Spuren anderer Verunreinigungen) wurde extrahiert. Die Umsetzung verlief ohne Verlust an Enantiomerenreinheit.

Rohausbeute: 357mg

Beispiel 9: Erzeugung von Enzympräparationen von Nitrilhydratase und Amidase zur Hydrolyse substituierter Cyanhydrine mittels rekombinanter Expression in *E. coli*

Zur Expression der Nitrilhydratase, sowie zur Expression der Amidase wurde das pMS470-Plasmidsystem herangezogen. Dieses Plasmid verfügt neben den replikativen Elementen, einer selektionierbaren Ampicillin-Resistenz und dem Lac-Repressor-Gen *lacI* über einen induzierbaren *tac*-Promotor, welcher eine gesteuerte Überexpression der einklonierten offenen Leserahmen erlaubt.

Expressionsplasmid für die *Rhodococcus erythropolis* NCIMB 11540 Nitrilhydratase:

Die Plasmidkarte ist in Abbildung 1 zu sehen. Das Plasmid trägt die Bezeichnung pMS470Nhse7.3. Es enthält neben den beiden Genabschnitten der Nitrilhydratase (α - und β -Untereinheit) noch einen dritten offenen Leserahmen, welcher für ein Aktivatorprotein codiert.

Expressionsplasmid für die *Rhodococcus erythropolis* NCIMB 11540 Amidase:

Anders als bei der Nitrilhydratase ist für die Expression der Amidase von *Rhodococcus erythropolis* NCIMB 11540 nur ein einziger Leserahmen notwendig und dieser wurde im Plasmid pMS470-33/3/1/11 hinter dem *tac*-Promotor einkloniert. Die Abbildung 2 zeigt die Plasmidkarte dieses Konstruktes.

Fermentation der rekombinanten Nitrilhydratase und Amidase

Die Fermentation der beiden Enzyme erfolgte grundsätzlich nach dem allgemeinen Protokoll, ausgearbeitet für die Überexpression von Enzymen im pMS470 System.

Dabei wurde:

- aus einer Über-Nacht-Kultur (ONC) in eine Hauptkultur mit LB-Medium und Antibiotikum im Schüttelkolben überimpft.

- bis in die exponentielle Phase anwachsen gelassen
- bei OD₆₀₀ (Optische Dichte bei 600nm) 0.8 bis 1.5 mit IPTG (Isopropylthiogalactopyranosid) induziert
- für 18h weiter induziert (Proteinexpression)
- geerntet (Zentrifugation) und aufgeschlossen (Ultraschall)

Expression der Nitrilhydratase

Die mit pMS470Nase7.3 (bzw. pMSNhasetactac7.3) transformierten *E. coli* B BL21 Zellen wurden auf LB-Ampicillin-Platten vereinzelt und eine ONC von 100ml LB-Ampicillin Medium mit einer Einzelkolonie beimpft. Am nächsten Morgen wurde eine Hauptkultur bestehend aus 250ml LB-Ampicillin Medium in einem 1000ml Schikankolben auf eine OD₆₀₀ von 0.01 bis 0.03 (Beckmann Photometer) beimpft. Die Wachstumstemperatur wurde auf 25°C eingeregelt, da bei höheren Temperaturen ausschließlich die Bildung von unlöslichen Einschlusskörperchen erfolgt. Nach Erreichen der Induktionsdichte (OD₆₀₀=1 Beckmann Photometer) wurden die Kulturen durch Zusatz von IPTG zu einer Konzentration von 0.1mM induziert. Zusätzlich wurden die Medien mit 0.1mM Ammoniumeisen(III)citrat supplementiert. Nach Erreichen einer OD₆₀₀>4 wurden die Kulturen geerntet (Zentrifugation bei ca. 3000*g für 15min) und einmal mit ca.100ml PBS-Puffer gewaschen. Das Zellpellet wurde im Anschluß in PBS-Puffer resuspendiert (ca. 5ml Gesamtvolumen) und mit einer Ultraschallsonde (BRANSON Sonifier 250, 60% Leistungseinstellung, Konstantbeschallung; 5 mal 30s mit je 1 min Pause zur Kühlung) aufgeschlossen (Visuelle Kontrolle der Vollständigkeit unter dem Mikroskop). Die so erhaltenen Rohlysate besaßen eine typische Aktivität von ca. 100-250 U/ml (ca. 350-500U/ml für pMSNhasetactac7.3), analysiert mit Methacrylonitril als Substrat unter den nachfolgend angeführten Bedingungen.

Zur Konservierung wurden die Lysate bei -20°C gelagert. Lagerung bei Raumtemperatur ist mit einem schnellen Verlust an Aktivität verbunden.

Aktivitätsbestimmung: Rohlysate wurden unmittelbar vor der Aktivitätsbestimmung 1:10 mit PBS-Puffer verdünnt. 1.4ml einer 40mM Methacrylonitril Lösung in PBS-Puffer wurden mit 20 μl des verdünnten Lysats versetzt und bei 28°C inkubiert (Eppendorf Thermomixer 5436). Zum Zeitpunkt 0, 1, 2, 5, 10 und 15 Minuten wurden 200 μl Proben entnommen und unmittelbar mit 800 μl 0.17% Phosphorsäure die Enzymreaktion in diesen Proben gestoppt. Nach Zentrifugation ($16000 \times g$, 10 Minuten) wurden die Proben spektrophotometrisch (Perkin Elmer UV/VIS-Spektrometer Lambda Bio) bei 224nm vermessen. Der Anstieg der Extinktion wurde mit der Zunahme der Konzentration an Methacrylamid korreliert, wobei ein ϵ -Wert von $0,57 \text{ l} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ herangezogen wurde.

Expression der Amidase

Die mit pMS470-33/3/1/11 transformierten *E. coli* B BL21 Zellen wurden auf LB-Ampicillin-Platten vereinzelt und eine ONC von 100ml LB-Ampicillin Medium mit einer Einzelkolonie beimpft. Am nächsten Morgen wurde eine Hauptkultur bestehend aus 250ml SOC-Ampicillin Medium in einem 1000ml Schikanenkolben auf eine OD_{600} von 0.01 bis 0.03 (Beckmann Photometer) beimpft. Die Wachstumstemperatur wurde auf 30°C eingeregelt, da die Fermentation bei 37°C ausschließlich zur Bildung von unlöslichem und inaktiven Protein führt. Nach Erreichen der Induktionsdichte ($\text{OD}_{600}=1$ Beckmann Photometer) wurden die Kulturen durch Zusatz von IPTG zu einer Konzentration von 0.3mM induziert. Nach einer Induktionszeit von 16h wurden die Zellen geerntet (Zentrifugation $3000 \times g$, 10min) und mit Natriumphosphatpuffer (0.1M, pH=7) gewaschen. Das gewonnene Pellett wurde auf ca. 5ml Gesamtvolumen im Waschpuffer resuspendiert und mit einer Ultraschallsonde (BRANSON Sonifier 250, 60% Leistungseinstellung, Konstantbeschallung; 5 mal 30s mit je 1 min Pause zur Kühlung) unter ständiger Kühlung bis zur Vollständigkeit aufgeschlossen (Visuelle Kontrolle der Vollständigkeit unter dem Mikroskop). Die derart gewonnenen Rohlysate

Bestimmung der Amidaseaktivität :

Substratlösung: 40 mM Acetamid in PBS

Lösung B: 0.5% (w/v) Nitroprussidnatrium in ddH₂O

Lösung D: 600ml handelsübliche Natriumhypochlorit-Lösung verdünnt auf 1000ml

1.4ml Substratlösung wurden mit 10µl Enzymverdünnung (1:10 in PBS) bei 30°C inkubiert (Eppendorf Thermomixer 5436). In 100µl Proben wurden nach 0, 1, 2, 5, 10 und 15 Minuten mit 20µl Lösung A die Enzymreaktion gestoppt. Nach Entnahme der letzten Probe wurden die so erhaltenen Lösungen mit 400µl Wasser verdünnt. Zur Kalibrierung wurden weitere Ammoniumstandard-Lösungen (je 500ml) mit 20µl Lösung A versetzt. Zu Proben sowie Standards wurden darauf 20µl der Lösung B und 50µl eines Gemisches von 4 Teilen Lösung C mit 1 Teil Lösung D zupipettiert. Gute Durchmischung wurde durch Vortexen sichergestellt. Die so behandelten Proben und Standards wurden bei 37°C für 15min belassen. Die entstandene Blaufärbung wurde nach Verdünnung aller Proben und Standards 1:10 mit Wasser im Spektrophotometer (Perkin Elmer UV/VIS-Spektrometer Lambda Bio) bei 640nm quantifiziert. Durch Korrelation der Zunahme der Blaufärbung über die Zeit mit den Extinktionswerten der Standards konnte auf die Aktivität (µMol freigesetztes Ammonium pro Minute) rückgerechnet werden.

Beispiel 10: Hydrolyse unter Verwendung des rekombinanten Enzyms

Bei diesen Umsetzungen wurde klonierte Nitrilhydratase von *Rhodococcus erythropolis* NCIMB 11540 als Rohlysat des *E. coli* Klons 7.3 (hergestellt gemäß Beispiel 9) verwendet.

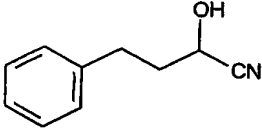
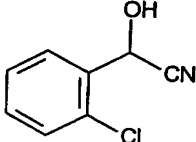
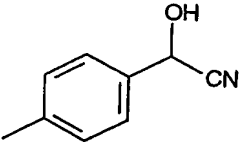
Durchführung:

50µL Rohlysat wurden mit 425µL Puffer (K/Na-PO₄-Puffer, pH 7, 50mM) verdünnt und mit 25µL einer ca. 200mM Substratlösung in DMSO versetzt (5mg Protein/mL S.-Konz. ca. 10mM, 5% DMSO). Die Umsetzung wurde im Thermomixer bei 30°C und 1000rpm durchgeführt. Nach 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 30, 60 und 120 Minuten wurde jeweils ein Eppendorfer mit 0.5mL 1N HCl versetzt. Nach Zentrifugation (5min, 13.000rpm) und entsprechender Verdünnung wurden die Konzentrationen von Cyanhydrin und Hydroxyamid mittels HPLC bestimmt. Die Aktivität der Nitrilhydratase wurde anhand der Geschwindigkeit der Bildung des Hydroxyamides ermittelt (Steigung im Anfangsbereich). Als Standardsubstrat (100% Aktivität) wurde 2-Hydroxy-4-phenyl-butyronitril verwendet. Die Aktivität bei der Hydrolyse der anderen Substrate wurde mit der Aktivität an 2-Hydroxy-4-phenyl-butyronitril verglichen (Tab. 5).

Ergebnisse:

Die Aktivität der Nitrilhydratase im Rohlysat des *E. coli* Klons 7.3 bei der Hydrolyse von 2-Hydroxy-4-phenyl-butyronitril betrug ca. 0.3µmol*mg⁻¹*min⁻¹. In Tabelle 5 ist ein Aktivitätsvergleich an den verschiedenen Substraten dargestellt.

Tabelle 5: Vergleich der Aktivität der Nitrilhydratase aus dem *E. coli* Klon 7.3 an den verschiedenen Substraten.

Substrat	Aktivität der Nitrilhydratase [%]
	100
	100
	60

Umsetzung von (*R*)-2-Chlormandelonitril im halb-präparativen Maßstab

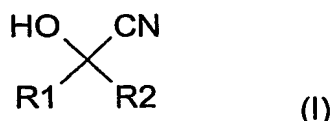
50mL eines Rohlysates der klonierten Nitrilhydratase von *Rhodococcus erythropolis* NCIMB 11540 (*E. coli* Klon 7.3, hergestellt gemäß Beispiel 9) wurden mit 100mL Puffer (K/Na-PO₄-Puffer, 50mM, pH 6.5) verdünnt. Nach Zusatz von 1.0g (*R*)-2-Chlormandelonitril (ee>99%) in 1.5mL DMSO wurde die Suspension bei 150rpm und 30°C geschüttelt. Nach vollständigem Umsatz wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert und das Produkt wurde 4 Tage mit CH₂Cl₂ kontinuierlich extrahiert.

ee des Rohproduktes: >99%

Ausbeute nach Reinigung: 0.91g (82%)

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung von chiralen α -Hydroxycarbonsäuren, dadurch gekennzeichnet, dass (R)- oder (S)-Cyanhydrine in Gegenwart von *Rhodococcus erythropolis* NCIMB 11540 durch enzymatische Hydrolyse in die korrespondierenden (R)- oder (S)- α -Hydroxycarbonsäuren überführt werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass (R)- oder (S)-Cyanhydrine als Edukte eingesetzt werden, die durch enzymatische oder chemisch katalysierte Addition einer Cyanidgruppe and die entsprechenden aliphatischen, aromatischen oder heteroaromatischen Aldehyde oder Ketone erhalten werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass (R)- oder (S)-Cyanhydrine der Formel



in der R1 und R2 unabhängig voneinander H, einen gegebenenfalls ein- oder mehrfach mit unter den Reaktionsbedingungen inerten Substituenten substituierten C_1 - C_6 -Alkyl- oder -Alkenylrest oder einen gegebenenfalls ein- oder mehrfach mit unter den Reaktionsbedingungen inerten Substituenten substituierten Phenylrest bedeuten, mit der Maßgabe, dass R1 und R2 nicht beide H sind, eingesetzt werden.

4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Mikroorganismus *Rhodococcus erythropolis* NCIMB 11540 in Form von gemahlenen Zellen, rohen oder gereinigten Enzymen, rekombinanten Enzymen, immobilisierten Zellen oder Enzymen, lyophilisierten Zellen oder von „resting cells“ eingesetzt wird.

5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Mikroorganismus *Rhodococcus erythropolis* NCIMB 11540 in einem wässrigen Medium suspendiert wird und die so erhaltene Suspension mit dem entsprechenden chiralen Cyanhydrin in Gegenwart eines Lösungsvermittlers als Cosolvens versetzt wird.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass als Lösungsvermittler organische Lösungsmittel, Tenside oder Phasentransferkatalysatoren eingesetzt werden.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass als organisches Lösungsmittel DMSO, DMF, C₁-C₆-Alkohole, TMBE oder Gemische derselben eingesetzt werden.
8. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass der Cosolvensanteil zwischen 0,5 und 20Vol% bezogen auf das Gesamtvolumen der Reaktionslösung liegt.
9. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der pH-Wert des Reaktionsgemisches zwischen 4.5 und 11 liegt.
10. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Hydrolyse bei einer Temperatur zwischen 10 und 60°C durchgeführt wird.
11. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass als rekombinantes Enzym ein durch Expression des pMS470-Plasmidsystems in einer geeigneten Wirtszelle erhaltenes Enzym eingesetzt wird.

O.Z.1244

26.02.2003



DSM Fine Chemicals Austria Nfg GmbH & Co KG

Zusammenfassung

Verfahren zur Herstellung von chiralen α -Hydroxycarbonsäuren, bei welchem (R)- oder (S)-Cyanhydrine in Gegenwart von *Rhodococcus erythropolis* NCIMB 11540 durch enzymatische Hydrolyse in die korrespondierenden (R)- oder (S)- α -Hydroxycarbonsäuren überführt werden.

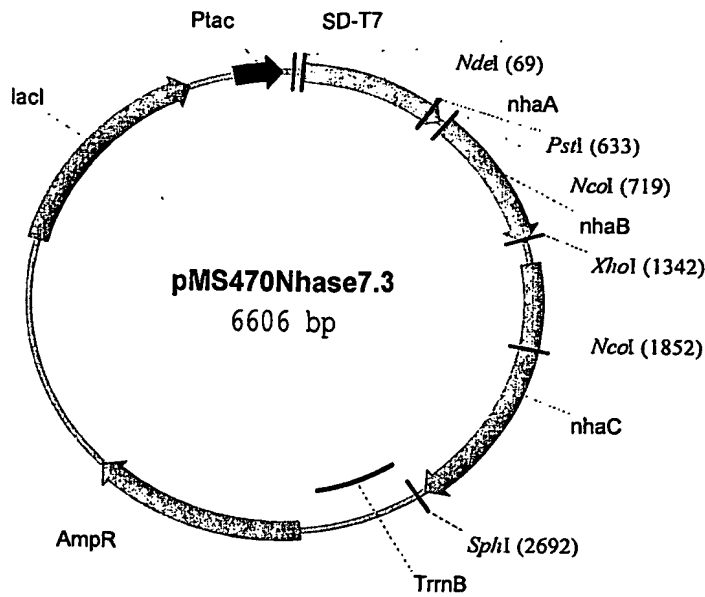


Abbildung 1: Plasmidkarte von pMS470Nhase7.3

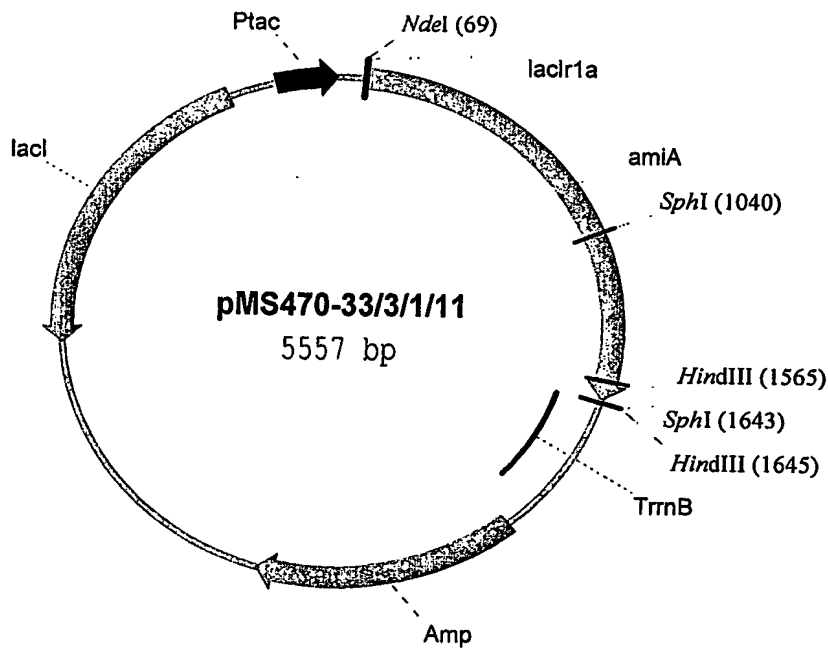


Abbildung 2: Plasmidkarte von pMS470-33/3/1/11

PCT Application
PCT/EP2004/000859



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.